昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，August 2007，50(8)：762 - 768　　ISSN 0454-6296

麦长管蚜烟碱型乙酰胆碱受体基因的克隆和序列分析

邱高辉，韩召军*

（南京农业大学，农业部病虫监测与治理重点开放实验室，南京　210095）

摘要：昆虫烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor，nAChR)是杀虫剂的重要作用靶标之一。本研究利用简并引物 PCR 和半巢式 PCR 技术从麦长管蚜 *Sitobion avenae*(Fabricius)中克隆 nAChR 基因，成功地获得了 5 个 α 型 nAChR 亚基的 cDNA 片段。根据 5 个 α 亚基片段设计特异引物，结合快速扩增 cDNA 末端(RACE)技术，成功克隆了 5 个 α 型亚基的全长，并发现 α5 亚基有两种存在形式，它们仅在胞外区有一段 175 bp 的片段有差异。序列分析发现，这些基因均具有 nAChR 基因家族的典型特征，并与已报道的其他昆虫的烟碱型乙酰胆碱受体的相应亚基具有很高的同源性。该研究为进一步利用基因表达技术研究昆虫 nAChR 的天然亚基组成，以及分析麦长管蚜对新烟碱类杀虫剂的靶标抗性，奠定了基础。

关键词：麦长管蚜；乙酰胆碱受体；基因克隆；序列分析

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2007)08-0762-07

Cloning and sequence analysis of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the grain aphid, *Sitobion avenae* (Fabricius)

QIU Gao-Hui, HAN Zhao-Jun* (Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Pests, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is one of the most important insecticide targets. In this study, five α-subunit genes from the grain aphid, *Sitobion avenae* (Fabricius) were cloned to their full-length with RT-PCR and RACE strategy. It was also found that the α5 subunit had two forms with only difference in a 175 bp fragment. Sequence analysis showed that these genes had all the characteristics of nAChR gene family and were high homology with the reported nAChR genes from other insects. This work facilitates the further studies on natural subunit composition of nAChR and the molecular mechanisms for target resistance to new nicotinic insecticides in this pest.

Key words: *Sitobion avenae*; nicotinic acetylcholine receptor; gene cloning; sequence analysis

麦长管蚜 *Sitobion avenae* (Fabricius)是我国各小麦产区常发性危害严重的害虫之一，而且是麦类病毒病的传播媒介，是小麦穗期(受害最敏感期)的优势麦蚜种群，能对小麦产量造成严重的影响。在我国登记用于麦蚜防治的药剂很多，但由于农药的长期使用，麦蚜对有机磷类、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类等常规药剂逐渐产生了抗药性(彭丽年等，2000；洪波等，2004)，故目前较多使用吡虫啉防治麦蚜。

吡虫啉是新烟碱类杀虫剂，是目前应用较为广泛的防治刺吸式口器害虫的高效药剂(王顺建等，2003；李建军等，2004)。吡虫啉不仅内吸性强，同时具有触杀和胃毒作用，对刺吸式害虫有特效，持效期长，而且其作用机理不同于常规药剂，主要作用于昆虫的烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor，nAChR)，阻断正常的神经传导，因此与常规杀虫剂很少有交互抗性，可以用来防治对常规杀虫剂产生抗性的刺吸式害虫。

但长期使用吡虫啉也会导致害虫对吡虫啉的抗性，因此，研究吡虫啉的靶标分子 nAChR 有利于进一步探讨其靶标抗性的分子机理。另一方面，虽然由于 nAChR 与脊椎动物的很多生理病变有关，目前对脊椎动物 nAChR 的研究已经比较系统，克隆了大

基金项目：国家重点基础研究发展规划‘973’项目(2006CB102003)；国家自然科学基金重点项目(30530530)

作者简介：邱高辉，男，1979 年 2 月生，河南周口人，博士研究生，E-mail：ghqiu@njau.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence，Tel.：025-84395245；E-mail：zjhan@njau.edu.cn

收稿日期 Received：2007-03-29；接受日期 Accepted：2007-07-18

量的亚基并进行了功能和药理特性的研究（Utkin *et al*.，2000；郭晨云等，2002；Novere *et al*.，2002），但作为杀虫剂的作用靶标，昆虫 nAChR 的研究却较少，仅从十几种昆虫中随机克隆了数十个 nAChR 亚基的基因（Huang *et al*.，1999；Grauso *et al*.，2002；Li and Han，2005；Liu *et al*.，2005；Bass *et al*.，2006；Jones *et al*.，2006），至今尚不知道昆虫 nAChR 的天然亚基组成，其功能的研究均是借助与高等动物辅助亚基共表达形成的功能受体。目前已经发现 nAChR 的基因突变可以导致害虫对吡虫啉产生高水平抗性（Liu *et al*.，2005），因此迫切需要弄清昆虫 nAChR 的天然亚基组成，以便进行新型高效杀虫剂的开发。

本研究根据已报道的昆虫 nAChR 氨基酸序列的保守区域设计简并引物，对小麦重要害虫麦长管蚜进行了 nAChR 基因的克隆和序列分析，为进一步研究昆虫 nAChR 的天然亚基组成，以及害虫对吡虫啉的靶标抗性机理，奠定了基础。

1　材料和方法

1.1　供试麦长管蚜

供试昆虫采自江苏省南京市郊区，于养虫室中饲养。饲养条件 温度（25 ± 1）℃，相对湿度 70% ~ 85%，光周期 14 L∶10D。

1.2　主要试剂和仪器

M-MLV 反转录酶、纯化试剂盒、pGEM-Teasy vector 均为 Promega 公司产品。TaqDNA 聚合酶由 TAKARA 公司提供。RACE 试剂盒（Smart Race cDNA Amplification Kit）为 Clontech 公司产品。PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成，PCR 仪由 MJ-research 公司生产，型号为 PTC-200。

1.3　总 RNA 的提取

取 30 mg 蚜虫于 1 mL 玻璃匀浆器中匀浆，用 Trizol 试剂盒（Life Technologies，Gaithersburg，MD）进行总 RNA 提取，所有操作均按试剂盒说明书进行。

1.4　单链 cDNA 的合成

取 Eppendorf 管 1 个，依次加入 1 ~ 2 μg 总 RNA，2 μL Oligod（T）18 引物（500 μg/mL），70℃水浴 5 min，冰浴 10 min 后，加 18 μL RT Master Mix。RT Master Mix 中包括：5 μL 5 × reaction buffer，5 μL dNTP（2.5 mmol/L），40 U RNAsin，200 U M-MLV 反转录酶（Promega 公司），6 μL SDW（RNase free）。在 PCR 仪中完成 cDNA 合成：42℃ 60 min，95℃ 5 min，4℃保存。

进行 nAChR 全长扩增时的 cDNA 模板的合成按 RACE 试剂盒说明书进行。

1.5　引物设计和 PCR 反应

根据 nAChR 保守区设计简并引物，克隆出 nAChR 亚基的 cDNA 片段后，利用 Primer Premier 软件设计 RACE 引物（gene specific primer，GSP），用于扩增 nAChR 基因的 5′-和 3′-端序列。本研究使用的 PCR 反应引物见表 1。

表 1　用于扩增麦长管蚜烟碱型乙酰胆碱受体亚基基因的简并引物和 RACE 引物

Table 1　The degenerate primers and gene-special primers for cloning of the nicotinic acetylcholine receptor subunit genes

引物 Primer	引物的核酸序列 Sequence of primer
简并上游引物 Sense degenerate primer	5′-ATHNTHACNACNAAYGTNTGG-3′
半巢式简并上游引物 Semi-nest sense degenerate primer	5′-TWYAAYAAYGCNGAYGG-3′
简并下游引物 Anti-sense degenerate primer	5′-ACNGTRTARAANARNGTYTT-3′
Saα1 的 3′-RACE 引物 3′-GSP for Saα1	5′-AAACCTCAAGCACATTGGTCAATTGGTG-3′
Saα1 的 5′-RACE 引物 5′-GSP for Saα1	5′-CCGAGGATGTCCCATTCCACGCTTG-3′
Saα2 的 3′-RACE 引物 3′-GSP for Saα2	5′-AGATACGGTTCCTCGCAGCACAC-3′
Saα2 的 5′-RACE 引物 5′-GSP for Saα2	5′-AGATACGGTTCCTCGCAGCACAC-3′
Saα3 的 3′-RACE 引物 3′-GSP for Saα3	5′-AATGGAGTCAGTGGTTCACGAGTTG-3′
Saα3 的 5′-RACE 引物 5′-GSP for Saα3	5′-CTCATTTCTTATTGCTGGAACCTCT-3′
Saα4 的 3′-RACE 引物 3′-GSP for Saα4	5′-GACCAATCGCAGGGCAGAAACC-3′
Saα4 的 5′-RACE 引物 5′-GSP for Saα4	5′-CGATGTGCCTCAAGTCTACCTGATTT-3′
Saα5 的 3′-RACE 引物 3′-GSP for Saα5	5′-ATGGACGAAAAGGTCGGTTCGAACATC-3′
Saα5 的 5′-RACE 引物 5′-GSP for Saα5	5′-CCCATTCGACCGACATGTAAAATTCTGAGAG-3′
用于鉴别 Saα5-1 的引物 GSP for Saα5-1	5′-GCCACCAAGGCGACCATATACCACGT-3′
用于鉴别 Saα5-2 的引物 GSP for Saα5-2	5′-ATGACAAAGGCGACCGTTTACTGTACG-3′

片段克隆采用降落 PCR 和半巢式 PCR 相结合的技术，PCR 反应体系参照 Taq 酶说明书。第 1 轮 PCR 退火温度从 55℃降至 42℃，每度 2 个循环，最后在退火温度 42℃进行 8 个循环。第 2 轮 PCR 采用半巢式，将第 1 轮 PCR 产物稀释 1 000 倍作为模板，退火温度从 61℃降至 50℃，每度 2 个循环，最后在退火温度 49℃进行 14 个循环。

5 个 α 亚基全长克隆的 PCR 条件参照 RACE 试剂盒说明书进行。

1.6 PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收和 DNA 纯化试剂盒纯化后，克隆于 pGEM-Teasy 载体上，用通用引物进行序列测定，所有测序工作均由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.7 序列分析

用 DNAssist 序列分析软件将 DNA 序列翻译成蛋白质序列，Blast 同源性搜索在 NCBI 网站进行，用 GeneDoc 软件进行同源性比较分析，CLUSTAL X 软件进行比较分析，利用 Phylip 软件绘制 nAChR 亚基的系统发育树（Page，1996）。

2 结果与分析

2.1 麦长管蚜烟碱型乙酰胆碱受体基因 cDNA 片段的克隆

利用简并引物 PCR 和半巢式 PCR 进行麦长管蚜 nAChR 的克隆，将目标带 PCR 产物纯化后克隆到 pGEM-Teasy 载体中，选取阳性克隆，用通用引物测序，得到了 5 个 α 型亚基的 cDNA 片段，5 个 α 型亚基的 cDNA 片段长度均为 396 bp，编码 132 个氨基酸残基（图 1）。

2.2 麦长管蚜烟碱型乙酰胆碱受体 α 型亚基全长序列的克隆

根据克隆的 5 个 α 型 nAChR 亚基的 cDNA 片段，设计 RACE 特异引物（表 1），进行 5 个亚基全长的克隆和测序，成功获得了 6 个亚基的全长（图 2），其中 Saα5 有 2 种存在形式，分别命名为 Saα1、Saα2、Saα3、Saα4、Saα5-1 和 Saα5-2。Saα1 基因长 1 674 bp，编码 496 个氨基酸；Saα2 全长 2 516 bp，编码 595 个氨基酸；Saα3 全长 1 763 bp，编码 537 个氨基酸；Saα4 全长 1 763 bp，编码 532 个氨基酸；Saα5-1、Saα5-2 长度均为 1 974 bp，编码 549 个氨基酸，其中 Saα1 5′端不完整。6 个亚基基因的 GenBank 登录号分别为 EF363700、EF363701、EF211977、EF363702、EF363703 和 EF363704。

从图 1 可以看出，麦长管蚜 nAChR α 型亚基的氨基酸序列，包含了配基结合密切相关的氨基酸、2 个糖基化位点、典型的双半胱氨酸和 4 个跨膜片段等 nAChR 基因 α 型亚基所具有的特征结构。

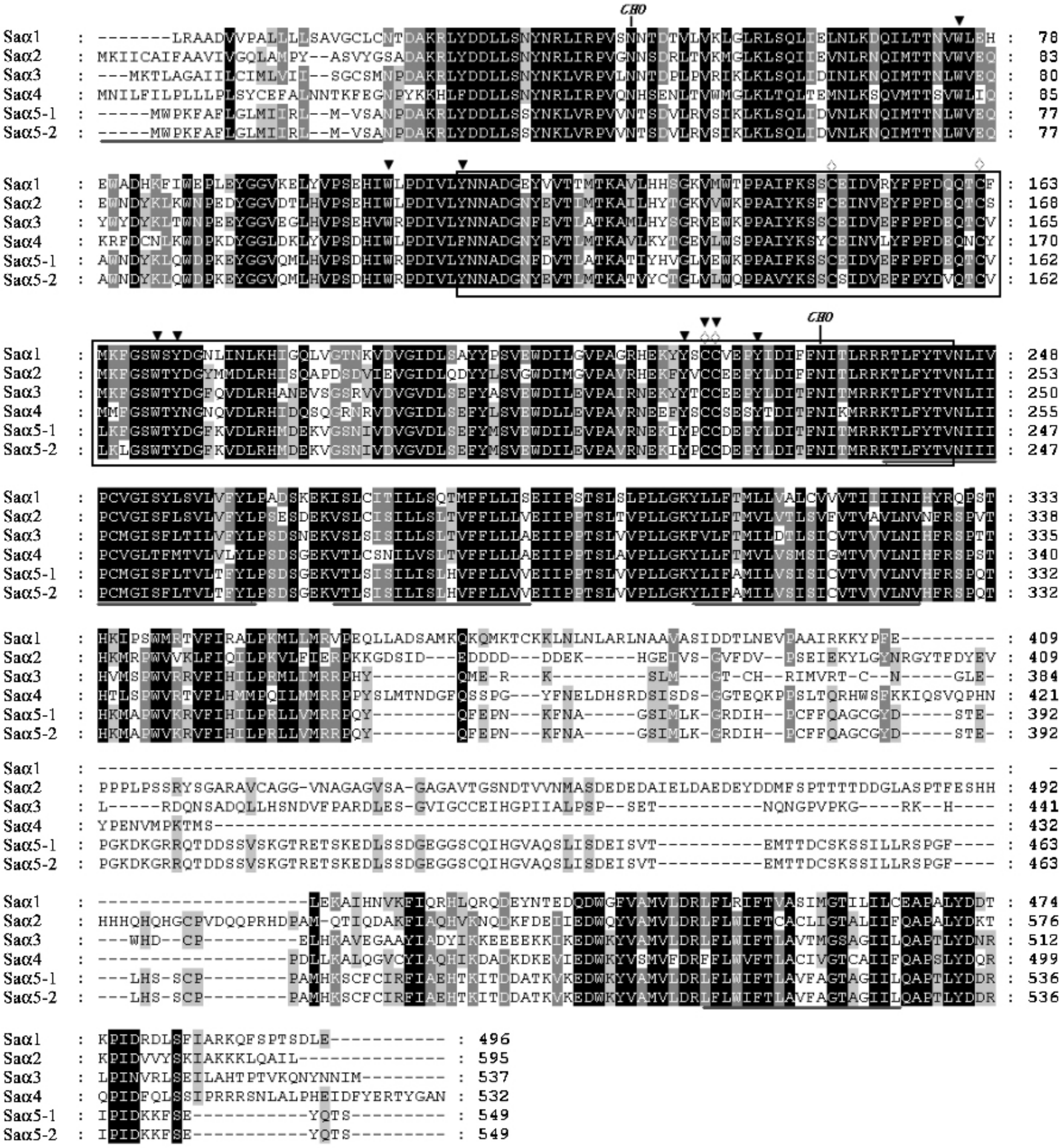
2.3 Saα5 的 2 种存在形式

在 Saα5 亚基的全长克隆过程中，作者发现 Saα5 亚基有 2 种存在形式，如图 1 所示，Saα5 亚基的两种形式仅有一段 175 bp 碱基序列不同（图 2），其余完全一样，两者氨基酸序列的同源性达到 97%。对 Saα5-1 和 Saα5-2 进行三维结构模拟（http://swissmodel.expasy.org/），发现两者的空间结构没有发生明显的变化。根据两者碱基序列的差异设计特异引物（表 1），结合 Saα5 的 5′-RACE 引物进行 PCR 验证后发现，Saα5 亚基的两种形式在麦蚜的单克隆中同时存在。同时作者在棉蚜中也发现了类似的现象（另文发表）。

2.4 麦长管蚜烟碱型乙酰胆碱受体亚基序列同源性及亲缘关系分析

在 GenBank 中对 5 个 α 型亚基的氨基酸序列进行 Blast 同源性搜索，发现它们与桃蚜、棉蚜、褐飞虱、果蝇、冈比亚按蚊、蜜蜂等昆虫的 nAChR 亚基具有很高的同源性（表 2），尤其与近缘种桃蚜、棉蚜 nAChR 亚基的同源性较高，有的高达 80%以上。

挑选以上物种的 nAChR 亚基的氨基酸序列用 CLUSTAL X 软件进行比较分析，然后以和昆虫 nAChR 有较近亲缘关系的果蝇 GABA 受体为外类群，用 Phylip 软件绘制了麦长管蚜 nAChR 亚基的系统发育树（图 3）。5 个 α 亚基均落入相应的 α 亚基类群，这与他人的研究结果一致（Huang *et al*.，1999；Li and Han，2005）。

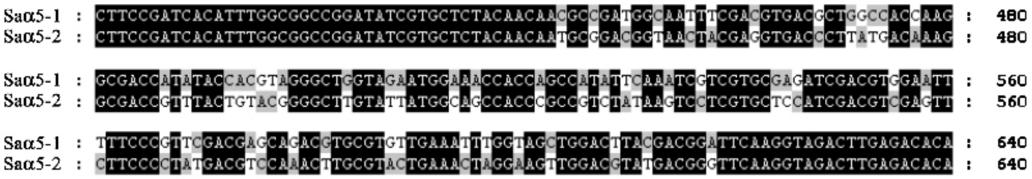


```
Saα1   : -------LRAADVVPALLLLSAVGCLCNTDAKRLYDDLLSNYNRLIRPVSNNTDTVLVKLGLRLSQLIELNLKDQILTTNVWLEH :  78
Saα2   : MKIICAIFAAVIVGQLAMPY--ASVYGSADAKRLYDDLLSNYNRLIRPVGNNSDRLTVKMGLKLSQIIEVNLRNQIMTTNVWVEQ :  83
Saα3   : ---MKTLAGAIILCIMLVII--SGCSMNPDAKRLYDDLLSNYNKLVRPVLNNTDPLPVRIKLKLSQLIDINLKNQIMTTNLWVEQ :  80
Saα4   : MNILFILPLLLPLSYCEFALNNTKFEGNPYKKHLFDDLLSNYNRLIRPVQNHSENLTVWMGLKLTQLTEMNLKSQVMTTSVWLIQ :  85
Saα5-1 : -----MWPKFAFLGLMIIRL--M-VSANPDAKRLYDDLLSSYNKLVRPVVNTSDVLRVSIKLKLSQLIDVNLKNQIMTTNLWVEQ :  77
Saα5-2 : -----MWPKFAFLGLMIIRL--M-VSANPDAKRLYDDLLSSYNKLVRPVVNTSDVLRVSIKLKLSQLIDVNLKNQIMTTNLWVEQ :  77

Saα1   : EWADHKFIWEPLEYGGVKELYVPSEHIWLPDIVLYNNADGEYVVTTMTKAVLHHSGKVMWTPPAIFKSSCEIDVRYFPFDQQTCF : 163
Saα2   : EWNDYKLKWNPEDYGGVDTLHVPSEHIWLPDIVLYNNADGNYEVTIMTKAILHYTGKVVWKPPAIYKSFCEINVEYFPFDEQTCS : 168
Saα3   : YWYDYKLTWNPEEYGGVEGLHVPSEHVWRPDIVLYNNADGNFEVTLATKAMLHYSGRVEWKPPAIYKSSCEIDVEFFPFDEQTCV : 165
Saα4   : KRFDCNLKWDPKDYGGLDKLYVPSDHIWLPDIVLFNNADGNYEVTLMTKAVLKYTGEVLWSPPAIYKSYCEINVLYFPFDEQNCY : 170
Saα5-1 : AWNDYKLQWDPKEYGGVQMLHVPSDHIWRPDIVLYNNADGNFDVTLATKATIYHVGLVEWKPPAIFKSSCEIDVEFFPFDEQTCV : 162
Saα5-2 : AWNDYKLQWDPKEYGGVQMLHVPSDHIWRPDIVLYNNADGNYEVTLMTKATVYCTGLVLWQPPAVYKSSCSIDVEFFPYDVQTCV : 162

Saα1   : MKFGSWSYDGNLINLKHIGQLVGTNKVDVGIDLSAYYPSVEWDILGVPAGRHEKYYSCCVEPYIDIFFNITLRRRTLFYTVNLIV : 248
Saα2   : MKFGSWTYDGYMMDLRHISQAPDSDVIEVGIDLQDYYLSVGWDIMGVPAVRHEKFYVCCEEPYLDIFFNITLRRKTLFYTVNLII : 253
Saα3   : MKFGSWTYDGFQVDLRHANEVSGSRVVDVGVDLSEFYASVEWDILEVPAIRNEKYYTCCEEPYLDITFNITMRRKTLFYTVNLII : 250
Saα4   : MMFGSWTYNGNQVDLRHIDQSQGRNRVDVGIDLSEFYLSVEWDLLEVPAVRNEEFYSCCSESYTDITFNIKMRRKTLFYTVNLII : 255
Saα5-1 : LKFGSWTYDGFKVDLRHMDEKVGSNIVDVGVDLSEFYMSVEWDILEVPAVRNEKIYPCCDEPYLDITFNITMRRKTLFYTVNIII : 247
Saα5-2 : LKLGSWTYDGFKVDLRHMDEKVGSNIVDVGVDLSEFYMSVEWDILEVPAVRNEKIYPCCDEPYLDITFNITMRRKTLFYTVNIII : 247

Saα1   : PCVGISYLSVLVFYLPADSKEKISLCITILLSQTMFFLLISEIIPSTSLSLPLLGKYLLFTMLLVALCVVVTIIIINIHYRQPST : 333
Saα2   : PCVGISFLSVLVFYLPSESDEKVSLCISILLSLTVFFLLVEIIPPTSLTVPLLGKYLLFTMVLVTLSVFVTVAVLNVNFRSPVT : 338
Saα3   : PCMGISFLTILVFYLPSDSNEKVSLSISILLSLTVFFLLAEIIPPTSLVVPLLGKFVLFTMILDTLSICVTVVVLNIHFRSPTT : 335
Saα4   : PCVGLTFMTVLVLYLPSDSGEKVTLCSNILVSLTVFFLLAEIIPPTSLAVPLLGKYLLFTMVLVSMSIGMTVVVLNIHFRSPST : 340
Saα5-1 : PCMGISFLTVLTFYLPSDSGEKVTLSISILISLHVFFLLVVEIIPPTSLVVPLLGKYLIFAMILVSISICVTVVVLNVHFRSPQT : 332
Saα5-2 : PCMGISFLTVLTFYLPSDSGEKVTLSISILISLHVFFLLVVEIIPPTSLVVPLLGKYLIFAMILVSISICVTVVVLNVHFRSPQT : 332

Saα1   : HKIPSWMRTVFIRALPKMLLMRVPEQLLADSAMKQKQMKTCKKLNLNLARLNAAVASIDDTLNEVPAAIRKKYPFE--------- : 409
Saα2   : HKMRPWVVKLFIQILPKVLFIERPKKGDSID---EDDDD---DDEK-----HGEIVS-GVFDV--PSEIEKYLGYNRGYTFDYEV : 409
Saα3   : HVMSPWVRRVFIHILPRMLIMRRPHY--------QME-R---K---------SLM---GT-CH--RIMVRT-C--N-----GLE- : 384
Saα4   : HTLSPWVRTVFLHMMPQILMMRRPPYSLMTNDGFQSSPG---YFNELDHSRDSISDS-GGTEQKPPSLTQRHWSFKKIQSVQPHN : 421
Saα5-1 : HKMAPWVKRVFIHILPRLLVMRRPQY--------QFEPN---KFNA-----GSIMLK-GRDIH--PCFFQAGCGYD-----STE- : 392
Saα5-2 : HKMAPWVKRVFIHILPRLLVMRRPQY--------QFEPN---KFNA-----GSIMLK-GRDIH--PCFFQAGCGYD-----STE- : 392

Saα1   : ------------------------------------------------------------------------------------- :   -
Saα2   : PPPLPSSRYSGARAVCAGG-VNAGAGVSA-GAGAVTGSNDTVVNMASDEDEDAIELDAEDEYDDMFSPTTTTDDGLASPTFESHH : 492
Saα3   : L-----RDQNSADQLLHSNDVFPARDLES-GVIGCCEIHGPIIALPSP--SET----------NQNGPVPKG----RK--H---- : 441
Saα4   : YPENVMPKTMS-------------------------------------------------------------------------- : 432
Saα5-1 : PGKDKGRRQTDDSSVSKGTRETSKEDLSSDGEGGSCQIHGVAQSLISDEISVT----------EMTTDCSKSSILLRSPGF---- : 463
Saα5-2 : PGKDKGRRQTDDSSVSKGTRETSKEDLSSDGEGGSCQIHGVAQSLISDEISVT----------EMTTDCSKSSILLRSPGF---- : 463

Saα1   : --------------------LEKAIHNVKFIQRHLQRQDEYNTEDQDWGFVAMVLDRLFLRIFTVASIMGTILIILCEAPALYDDT : 474
Saα2   : HHHQHQHGCPVDQQPRHDPAM-QTIQDAKFIAQHVKNQDKFDEIIEDWQYVAMVLDRLFLWIFTCACLIGTALIIFQAPALYDKT : 576
Saα3   : ---WHD--CP---------ELHKAVEGAAYIADYIKKEEEEKKIKEDWKYVAMVLDRLFLWIFTLAVTMGSAGIILQAPTLYDNR : 512
Saα4   : ------------------PDLLKALQGVCYIAQHIKDADKDKEVIEDWKYVSMVFDRFFLWVFTLACIVGTCAIIFQAPSLYDQR : 499
Saα5-1 : ---LHS-SCP---------PAMHKSCFCIRFIAEHTKITDDATKVKEDWKYVAMVLDRLFLWIFTLAVFAGTAGIILQAPTLYDDR : 536
Saα5-2 : ---LHS-SCP---------PAMHKSCFCIRFIAEHTKITDDATKVKEDWKYVAMVLDRLFLWIFTLAVFAGTAGIILQAPTLYDDR : 536

Saα1   : KPIDRDLSFIARKQFSPTSDLE----------- : 496
Saα2   : KPIDVVYSKIAKKKLQAIL-------------- : 595
Saα3   : LPINVRLSEILAHTPTVKQNYNNIM-------- : 537
Saα4   : QPIDFQLSSIPRRRSNLALPHEIDFYERTYGAN : 532
Saα5-1 : IPIDKKFSE-----------YQTS--------- : 549
Saα5-2 : IPIDKKFSE-----------YQTS--------- : 549
```

图 1　麦长管蚜 α 型 nAChR 亚基的氨基酸序列比对

Fig. 1　Amino acid sequence alignment of nAChR α subunits from *Sitobion avenae*

信号肽和 4 个跨膜区域用下划线表示；方框中部分为最初兼并引物克隆的片段；显示了糖基化位点（CHO）；黑三角表示与配基结合密切相关的氨基酸残基；菱形表示保守的半胱氨酸。 Predicted signal peptide and four transmembrance domains are underlined. The cDNA fragments cloned with degenerate primers are shown by box. Two conserved *N*-glycosylation sites（CHO）are shown，and key residues thought to be involved in ligand binding are indicated by black triangles. Four important cysteines are denoted by diamonds.



```
Saα5-1 : CTTCCGATCACATTTGGCGGCCGGATATCGTGCTCTACAACAACGCCGATGGCAATTTCGACGTGACGCTGGCCACCAAG : 480
Saα5-2 : CTTCCGATCACATTTGGCGGCCGGATATCGTGCTCTACAACAATGCGGACGGTAACTACGAGGTGACCCTTATGACAAAG : 480

Saα5-1 : GCGACCATATACCACGTAGGGCTGGTAGAATGGAAACCACCAGCCATATTCAAATCGTCGTGCGAGATCGACGTGGAATT : 560
Saα5-2 : GCGACCGTTTACTGTACGGGGCTTGTATTATGGCAGCCACCCGCCGTCTATAAGTCCTCGTGCTCCATCGACGTCGAGTT : 560

Saα5-1 : TTTCCCGTTCGACGAGCAGACGTGCGTGTTGAAATTTGGTAGCTGGACTTACGACGGATTCAAGGTAGACTTGAGACACA : 640
Saα5-2 : CTTCCCCTATGACGTCCAAACTTGCGTACTGAAACTAGGAAGTTGGACGTATGACGGGTTCAAGGTAGACTTGAGACACA : 640
```

图 2　麦长管蚜 α5 亚基 2 种存在形式的碱基差异

Fig. 2　Alignment of two forms of Saα5 from *Sitobion avenae*

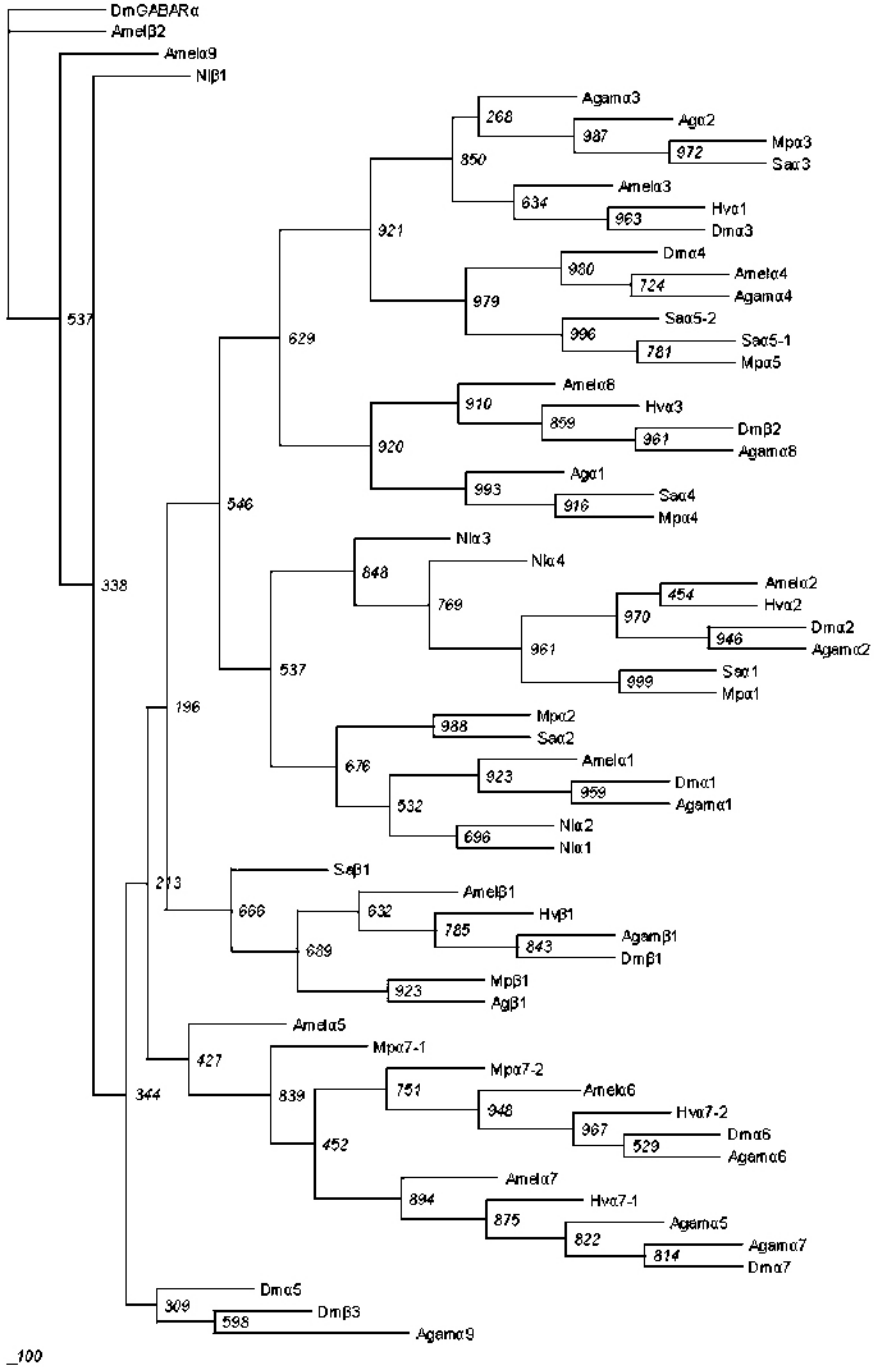


图 3　用 Phylip **软件包构建的昆虫乙酰胆碱受体的系统发育树**

Fig. 3　Dendrogram of insect nicotinic acetylcholine receptor constructed using Phylip software package

所用乙酰胆碱受体的来源和 GenBank **登录号** Source of acetylcholine receptor and GenBank accession no. **黑腹果蝇** *Drosophila melanogaster*：Dmα1(CAA30172)，Dmα2 (CAA36517)，Dmα3 (CAA75688)，Dmα4 (CAB77445)，Dmα5 (AAM13390)，Dmα6 (AAM13392)，Dmα7 (AAK67257)，Dmβ1 (CAA27641)，Dmβ2 (CAA39211)，Dmβ3 (CAC48166)，DmGABARα (AAA28556)；**冈比亚按蚊** *Anopheles gambiae*：Agamα1 (AY705394)，Agamα2 (AY705395)，Agamα3 (AY705396)，Agamα4 (AY705397)，Agamα5 (AY705399)，Agamα6 (AY705400)，Agamα7 (AY705402)，Agamα8 (AY705403)，Agamα9 (AY705404)，Agamβ1 (AY705405)；**意大利蜜蜂** *Apis mellifera*：Amelα1 (DQ026031)，Amelα2 (AY540846)，Amelα3 (DQ026032)，Amelα4 (DQ026034)，Amelα5 (AY569781)，Amelα6 (DQ026035)，Amelα7 (AY500239)，Amelα8 (AF514804)，Amelα9 (DQ026037)，Amelβ1 (DQ026038)，Amelβ2 (DQ026039)；**桃蚜** *Myzus persicae*：Mpα1 (X81887)，Mpα2 (X81888)，Mpα3 (AJ236786)，Mpα4 (AJ236787)，Mpα5 (AJ880084)，Mpα7-1 (AJ880085)，Mpα7-2 (AJ880086)，Mpβ1 (AJ251838)；**棉蚜** *Aphis gossypii*：Agα1 (AF527783)，Agα2 (AF527784)，Agβ1 (AF527785)；**褐飞虱** *Nilaparvata lugens*：Nlα1 (AY378698)，Nlα2 (AY378699)，Nlα3 (AY378700)，Nlα4 (AY378702)，Nlβ1 (AY378703).

表 2 麦长管蚜 nAChR α 亚基与其他昆虫 nAChR α 亚基的同源性（%）

Table 2 Identity（%）of the six subunits from *Sitobion avenae* to other members of insect nAChR family

	Saα1	Saα2	Saα3	Saα4	Saα5-1	Saα5-2
桃蚜 *Myzus persicae* Mpα1	88*	44	46	42	41	41
桃蚜 *M*. *persicae* Mpα2	44	98*	49	45	47	47
桃蚜 *M*. *persicae* Mpα3	47	49	98*	51	60	59
桃蚜 *M*. *persicae* Mpα4	44	45	51	99*	46	47
桃蚜 *M*. *persicae* Mpα5	42	47	60	46	99*	97*
棉蚜 *Aphis gossypii* Agα1	44	45	51	97*	46	46
棉蚜 *A*. *gossypii* Agα2	42	44	83*	44	53	52
褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Nlα2	44	54	45	42	44	44
黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Dα1	46	64	50	47	49	49
黑腹果蝇 *D*. *melanogaster* Dmα2	63	45	44	42	42	41
黑腹果蝇 *D*. *melanogaster* Dmα4	42	46	58	46	70*	68
冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* Agamα4	42	46	57	46	70*	72*
冈比亚按蚊 *A*. *gambiae* Agamα8	46	48	52	61	50	50
烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* Hvα1	48	48	69	52	60	59
意大利蜜蜂 *Apis mellifera* Amelα3	45	48	69	49	62	61
意大利蜜蜂 *A*. *mellifera* Amelα4	42	47	60	47	73*	72*

*：氨基酸同源性达到 70%以上 Showing identity of amino acids≥70%.

3 讨论

本研究利用昆虫的乙酰胆碱受体基因设计简并引物，成功从麦长管蚜中克隆了 5 个 α 型 nAChR 的 cDNA 片段，并根据 cDNA 片段设计 RACE 引物克隆了 5 个 α 型亚基的全长。这些亚基与其他昆虫的 nAChR 亚基具有较高的同源性，尤其是与近缘种桃蚜、棉蚜的同源性较高，在系统发育树上的关系比较靠近。5 个 α 型亚基结构特征分析显示，它们均具有昆虫烟碱型乙酰胆碱受体 α 型亚基的典型特征，如保守的双半胱氨酸结构、与配基结合密切相关的保守氨基酸、4 个跨膜片段等。这说明本研究所克隆的 5 个基因均为麦长管蚜的烟碱型乙酰胆碱受体亚基基因。

麦长管蚜的 α5 亚基的 2 种存在形式是由于大量碱基的替换造成的，导致了 α5 亚基的 N 端胞外区氨基酸残基的差异，但空间结构模拟并没有发现明显差异。这种现象是否由于 mRNA 的可变剪接造成，2 种形式的 α5 亚基在功能上是否存在差异，以及这种现象在昆虫中是否具有普遍性，还有待于进一步验证。

随着刺吸式害虫对有机磷类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类等药剂产生较高的抗药性，新烟碱类杀虫剂吡虫啉等成为防治刺吸式害虫的当家药剂。自从烟碱型乙酰胆碱受体亚基的突变导致褐飞虱对吡虫啉产生较高抗性首次被报道后，害虫对吡虫啉的抗药性引起了抗性研究者的重视。本研究克隆了麦长管蚜的 5 个 α 型亚基的全长，为进一步研究害虫抗药性与药剂作用靶标结构的关系、评估麦蚜对吡虫啉的抗性风险奠定了基础。

参 考 文 献（References）

Bass C，Lansdell SJ，Millar NS，Schroeder I，Turberg A，Field LM，Williamson MS，2006. Molecular characterisation of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the cat flea，*Ctenocephalides felis*（Siphonoptera：Pulicidae）. *Insect Biochem*. *Mol*. *Biol*.，36（1）：86－96.

Hong B，Guan XQ，Chi YW，Shi HL，Wen ZL，2004. Bioassay of the sensitivity of wheat aphids to several insecticides in Ningxia. *Journal of Ningxia Agricultural College*，25（3）：17－20.［洪波，关晓庆，迟永伟，施惠玲，温仲乐，2004. 宁夏地区麦蚜对几种杀虫剂的敏感性测定. 宁夏农学院学报，25（3）：17－20］

Grauso M，Reenan RA，Culetto E，Sattelle DB，2002. Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes，Dalpha5，Dalpha6 and Dalpha7，in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conservative target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I Pre-mRNA editing. *Genetics*，160（4）：1 519－1 533.

Guo CY，Li ZY，Yuan JM，2002. The recent advances of the structure and function of acetylcholine receptor. *Progress in Biotechnology*，22（4）：40－43.［郭晨云，李卓玉，袁静明，2002. 乙酰胆碱受体结构和功能的研究进展. 中国生物工程杂志，22（4）：40－43］

Huang Y，Williamson MS，Devonshire AL，Windass JD，Lansdell SJ，Millar NS，1999. Molecular characterization and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *J*. *Neurochem*.，73：380－389.

Li F，Han ZJ，2005. Alternative splicing，multiple transcription initiation sites of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the cotton aphid *Aphis gossypii*. *Acta Zoologica Sinica*，51（5）：867－878.

Li JJ，Li XL，Cheng WN，Wu AR，2004. The efficacy of different insecticides to wheat aphids and the impact to natural enemy. *Acta*

Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 13(3):52-55. [**李建军,李修炼,成卫宁,吴爱茹**,2004. **几种不同类型药剂防治麦蚜的效果及对天敌的影响**.**西北农业学报**,13(3):52-55]

Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han ZJ, Millar NS, 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *PNAS*, 102(24):8 420-8 425.

Novere NL, Corringer PJ, Changeux JP, 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J. Neurobiol.*, 53:447-456.

Jones AK, Delpech VR, Thany SH, Guathier M, Sattelle DB, 2006. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Research*, 16(11):1 422-1 430.

Page RDM, 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.*, 12:357-358.

Peng LN, Zhang XP, Ye JS, Zuo Y, 2000. Study of resistance to insecticides in *Macrosiphum avenae* F. in Sichuan Province. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2(3):13-18. [**彭丽年,张小平,叶建生,左燕**,2000. **四川省麦长管蚜的抗药性研究**.**农药学学报**,2(3):13-18]

Wang SJ, Liu GR, Wang XY, Song AY, Huang J, 2003. The evaluation of the efficacy of 12 insecticides to wheat aphid and their safety to the predatory enemies. *Pesticide Science and Administration*, 24(1):26-28. [**王顺建,刘光荣,王向阳,宋爱颖,黄娟**,2003.12 **种药剂防治麦蚜及对天敌安全性田间试验**.**农药科学与管理**,24(1):26-28]

Utkin YN, Tsetlin VI, Hucho F, 2000. Structural organization of nicotinic acetylcholine receptors. *Membr. Cell Biol.*, 13(2):143-164.

(责任编辑:黄玲巧)